

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM EQUINOS**

Sónia Custódia Teixeira Macedo

Orientador

**Professor Doutor António Luis Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha**

Co-Orientadores

**Professora Doutora Maria da Graça Cunha Antunes Lopes**

**Professor Doutor Tiago Pessanha Guimarães**

Porto 2014

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM EQUINOS**

Sónia Custódia Teixeira Macedo

Orientador

**Professor Doutor António Luis Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha**

Co-Orientadores

**Professora Doutora Maria da Graça Cunha Antunes Lopes**

**Professor Doutor Tiago Pessanha Guimarães**

Porto 2014

## RESUMO

O presente relatório descreve e enquadra as actividades desenvolvidas ao longo das dezasseis semanas que compõem o estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

O estágio decorreu no Centro de Reprodução Animal de Vairão onde foi possível acompanhar e participar em todo o trabalho de teriogenologia de equinos, nomeadamente:

- manejo reprodutivo das éguas;
- colheita, avaliação e processamento de sémen;
- avaliação da fertilidade potencial do garanhão;
- inseminação artificial;
- colheita, processamento e avaliação de citologias do endométrio;
- colheita e avaliação de biópsias do endométrio;
- *flushing* uterino para recolha de embriões - actividade inserida num projecto de investigação relacionado com a vitrificação de blastocistos;
- recolha e seleção de oócitos de equinos a partir de ovários recolhidos em matadouro - actividade inserida num projecto de investigação relacionado com a vitrificação de oócitos.

O acompanhamento das actividades da clínica ambulatoria de reprodução possibilitou, para além do aprofundamento de conhecimentos clínicos como o diagnóstico de gestação, o contacto mais próximo com proprietários e o ambiente particular que rodeia cada cavalo.

No final do período de estágio foi possível pôr em prática um trabalho experimental previamente desenhado pela estudante, tendo como objectivo principal comparar as taxas de recuperação de espermatozóides após centrifugação com e sem CushionFluid™ (Minitube).

Terminado o estágio pode afirmar-se que foram alcançados os objectivos pedagógicos previamente propostos:

- obter conhecimento prático do método científico e adquirir técnicas de investigação em reprodução assistida de equinos;
- capacitar a estagiária para trabalhar autonomamente em reprodução assistida de equinos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor António Rocha, pelo sorriso, pela boa disposição, pela forma desprestenciosa e generosa como partilha o seu conhecimento, pelo extraordinário Professor e pessoa que é. Foi um privilégio ter sido sua aluna.

À Professora Graça Lopes por ter despertado o meu interesse pela Teriogenologia, pela disponibilidade, por me dar sempre a oportunidade de aprender.

Ao Professor Tiago Guimarães por tudo o que me ensinou, por me deixar aprender a ser autónoma.

À Professora Beatriz García e ao Professor Lauro Fernández por estarem sempre disponíveis para me ensinar mais uma técnica ou explicar mais um procedimento.

A todos os Professores do ICBAS que contribuíram para a minha formação.

À Jordana Lopes por ter apoiado os meus primeiros passos no mundo da ecografia.

À Joana Duarte pela excelente companheira de trabalho que é.

À minha Mãe pelo exemplo de coragem, de abnegação, pelo amor incondicional, por me permitir partilhar a vida com amigos de 4 patas desde que nasci.

À minha Irmã por ser a melhor pessoa que conheço, por tudo... pela vida partilhada, pelos longos diálogos em silêncio, por ler o meu olhar como ninguém.

Ao Manuel por ser o meu equilíbrio, por me ensinar todos os dias a relativizar, pelo apoio constante e incondicional, por acreditar em mim.

À Ana, Cate, Fati, Leo, Mariana, Sara, Tata, convosco passei momentos fantásticos e sem a vossa companhia isto não tinha a mesma piada.

Ao Tomás, a minha alma gémea, à Margarida a minha princesa e fonte inesgotável de alegria, que por serem perfeitos me fazem tentar ser todos os dias uma pessoa um bocadinho melhor.



## ABREVIATURAS

% - percentagem

°C - graus Celsius

µL - microlitro

**BID** - duas vezes ao dia

**BSA** - albumina sérica bovina

**CASA** - análise de sêmen assistida por computador

**cm** - centímetro

**CRAV** - Centro de Reprodução Animal de Vairão

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**FITC** - isotiocianato de fluoresceína

**hCG** - gonadotrofina coriônica humana

**IM** - intramuscular

**IV** - intravenoso

**mm** - milímetro

**PBS** - solução salina tamponada com fosfato

**PGF<sub>2α</sub>** - prostaglandina F<sub>2α</sub>

**PGE** - prostaglandina E

**PNA** - aglutinina do amendoim *Arachis hypogea*

**TID** - três vezes ao dia

**UI** - unidades internacionais

**VA** - vagina artificial

# ÍNDICE

Resumo	i
Agradecimentos	ii
Abreviaturas	iii
Introdução	1
Casuística e enquadramento teórico	3
Maneio reprodutivo das éguas	3
Condição corporal	5
Inseminação Artificial	6
Recolha, processamento e avaliação de sémen	9
Avaliação de sémen	13
Avaliação macroscópica	14
Avaliação microscópica	14
Concentração	14
Morfologia	15
Integridade das membranas e dos organelos	16
Lavagem uterina para recolha de embriões	17
Recolha e seleção de oócitos	18
Trabalho experimental	19
Introdução	19
Materiais e métodos	19
Resultados	21
Discussão	24
Conclusão	25
Bibliografia	26
Anexos	31
Anexo I. Ficha Ginecológica da Gorongosa	32
Anexo II. Casuística	34
Anexo III. Protocolo: centrifugação com e sem cushion	35
Anexo IV. Protocolo: FITC-PNA	37

## INTRODUÇÃO

O papel que o cavalo desempenha nas sociedades modernas tem vindo paulatinamente a alterar-se, assumindo cada vez mais importância em actividades desportivas e de lazer em detrimento do trabalho agrícola (Aurich & Aurich 2006).

Os garanhões não costumam ser seleccionados com base na sua performance reprodutiva. A genética e os desempenhos atlético e desportivo alicerçam geralmente a selecção reprodutiva (Brito 2007) e raramente, a fertilidade é um critério tido em conta (Loomis 2006). Deste modo, temos um elevado número de garanhões reprodutores, que embora possuam características desejadas, são sub-férteis pelos mais diversos motivos, alguns dos quais passíveis de serem transmitidos à descendência (Loomis 2006).

A expansão mundial da maioria das raças de cavalos, alimentou nos criadores o desejo de beneficiar de alguma forma, da genética dos garanhões de topo. A inseminação artificial materializa este desejo permitindo a utilização de sémen destes garanhões, independentemente do lugar onde se encontrem (Aurich & Aurich 2006).

O incremento na qualidade dos diluidores e dos crioprotectores resultou no aumento do transporte de sémen para inseminações com sémen refrigerado e congelado (Allen 2005). Esta crescente utilização da inseminação artificial com sémen refrigerado e particularmente a utilização de sémen congelado vendido sob a forma de doses inseminantes sem garantia real de fertilidade, veio colocar o enfoque na avaliação do sémen (Brito 2007). A utilização de métodos mais eficazes de indução da ovulação e da sincronização deaios, o desenvolvimento de técnicas menos invasivas na transferência de embriões, a par de uma crescente abertura das associações de registo de raças para a utilização de técnicas de reprodução assistida, contribuíram para um aumento da utilização das mesmas na prática clínica de equinos (Allen 2005).

Os serviços prestados pela entidade acolhedora do estágio - Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV) espelham a diversidade e a crescente importância que a reprodução assistida tem na prática clínica de equinos.

Localizado em Vairão, Vila do Conde, o CRAV nasceu em 2005 com o objectivo de providenciar aos criadores e proprietários serviços no âmbito da medicina reprodutiva e da aplicação de biotecnologias reprodutivas, disponibilizando os seguintes serviços:

- inseminação com sémen fresco, refrigerado e congelado;
- biópsia, citologia e microbiologia uterinas;
- tratamento de patologias reprodutivas;
- diagnóstico de gestação;
- tratamento e internamento de éguas com partos de risco;
- exame de pré compra de reprodutoras e reprodutores;
- redução de gestações gemelares;
- episiotomia e vulvoplastia;

- recolha e transferência de embriões;
- avaliação da fertilidade potencial do garanhão;
- colheita e avaliação de sémen;
- processamento e acondicionamento de sémen refrigerado;
- criopreservação de sémen e embriões.

# CASUÍSTICA E ENQUADRAMENTO TEÓRICO

## MANEIO REPRODUTIVO DAS ÉGUAS

A fêmea do cavalo doméstico (*Equus caballus*) é poliéstrica sazonal, ainda que aproximadamente um terço das éguas de raças de corrida possam ciclar durante todo o ano. O anestro invernal e o subsequente período de transição vernal estão relacionados com a duração do dia e podem ser influenciados pela nutrição, condição corporal e metabolismo, temperatura ambiente e raça (figura I). A primeira ovulação do ano marca o início da época reprodutiva, podendo o período de transição vernal ser antecipado através da manipulação do fotoperíodo, utilizando para isso luz artificial (Wespi *et al.* 2014).

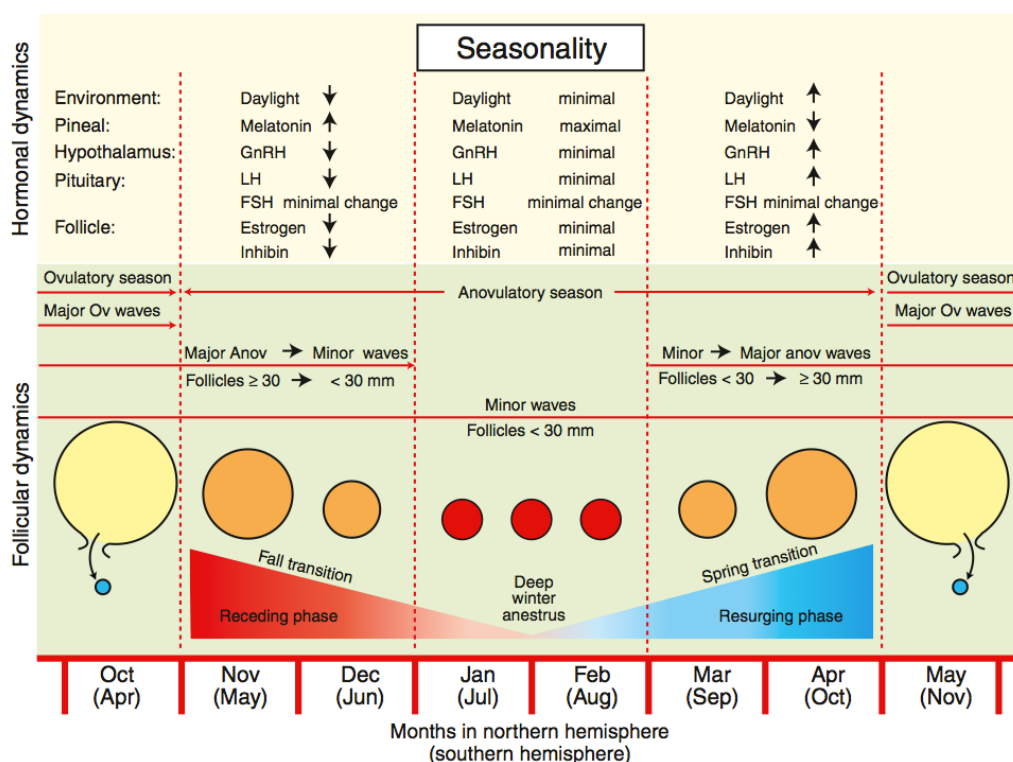


Figura I. Os efeitos da luz do dia nas hormonas reprodutivas, a sua influência no desenvolvimento folicular e na ovulação durante a transição e o anestro das éguas (segundo Bergfelt 2009).

As actividades desenvolvidas no período inicial do estágio relacionaram-se sobretudo com o manejo reprodutivo das éguas “residentes” do CRAV, principalmente das receptoras de embriões e alicerçou-se numa rufiação regular (*teasing*). A rufiação deve realizar-se dia sim, dia não normalmente às segundas, quartas e sextas, em todas as éguas que podem entrar em estro (Eilts 2012). A utilização de um garanhão com boa libido pode ser muito vantajosa e estudos mostram que a proximidade com o garanhão antecipa significativamente a primeira ovulação (Wespi *et al.* 2014) e influencia de forma positiva o comportamento sexual e a ciclicidade das fêmeas (Ricketts 2008). Devem por isso ser aplicados tempo e paciência a esta prática, e guardados todos os registos obtidos (Ricketts 2008). A análise destes registos

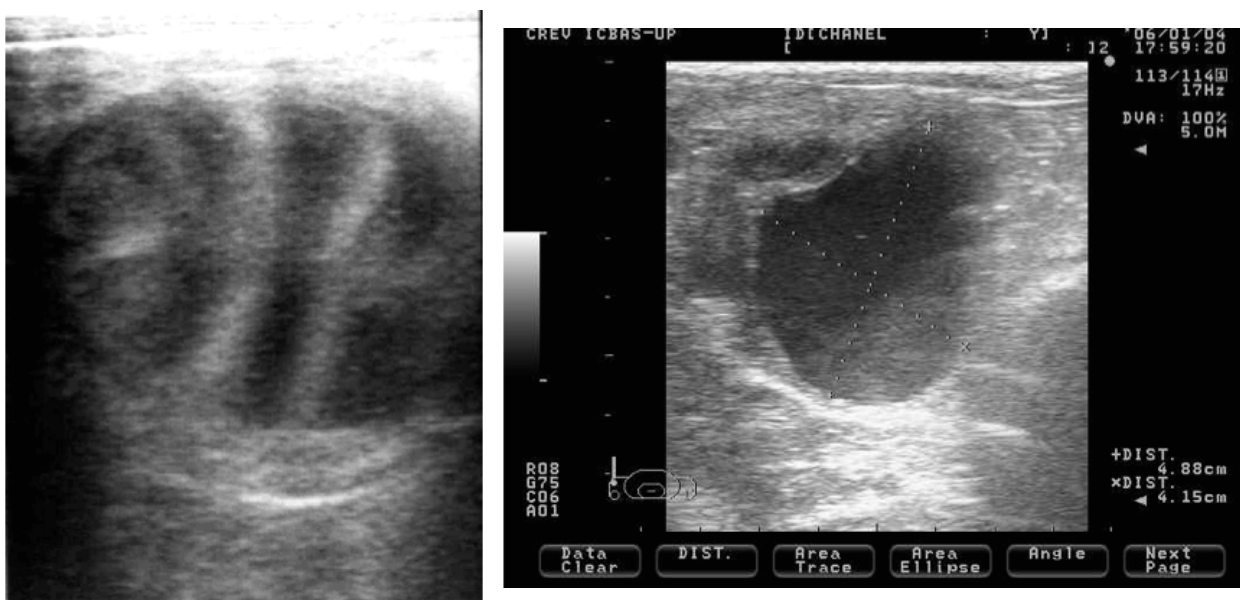
permite entender as variações individuais, já que cada égua responde de forma particular ao garanhão e sabendo o que é normal em cada égua podemos entender o que determinadas reacções significam.

Uma égua em estro é tipicamente submissa face aos avanços do garanhão, coloca as orelhas para a frente ou em posição neutra, baixa a garupa, levanta a cauda, afasta os membros posteriores, urina e everte ritmicamente o clitóris (*winking*) (Ricketts 2008, McCue *et al.* 2011) (figura II). Na ecografia podem ser observados edema uterino (figura III) e folículos com diâmetro crescente, passando do formato esférico para cónico pré-ovulatório (figura IV).



Figura II. Égua exibindo sinais de cio, *winking*.

Sónia Macedo 2014



Figuras III e IV. Imagens ecográficas de edema uterino grau 3 e de um folículo pré-ovulatório (imagens gentilmente cedidas pelo Professor António Rocha).

A expressão de comportamento de cio nem sempre é indicativa de estro. Este comportamento pode ser exibido durante a transição vernal, sendo muitas vezes acompanhado de folículos grandes e anovulatórios (Sharp 2011). Este facto marcou a transição vernal das

éguas em manejo e pode ser comprovado pela análise dos registos, onde se podem encontrar diversos exemplos de éguas com comportamento de cio e com folículos grandes que não chegaram a ovular. A título de exemplo podem analisar-se os registos da égua Gorongosa, disponíveis em anexo I, que no dia 12 de Março de 2014 exibia sinais de cio e edema uterino grau 3, no dia 24 do mesmo mês apresentava um folículo de 40 mm de diâmetro no ovário esquerdo e só viria a ovular entre os dias 17 e 21 de Abril de 2014.

No período de transição vernal pode encontrar-se um comportamento de cio prolongado e irregular acompanhado por uma pronunciada actividade folicular (vários folículos e de diversos tamanhos) na ausência de corpo lúteo, fazendo deste período um desafio para os veterinários (Bergfelt 2009, Wespi *et al.* 2014). Estudos demonstram que durante o período de transição antes da primeira ovulação do ano, podem ocorrer sete ondas de crescimento folicular com desenvolvimento de edema uterino (Brinsko *et al.* 2011a) e que os índices de crescimento dos folículos dominantes anovulatórios são idênticos aos dos folículos ovulatórios (Bergfelt 2009).

Os registos ecográficos e os dados relativos à detecção de cios permitem identificar o período de transição vernal e demarcar o início do estro, de forma a não perder ovulações e a não desperdiçar recursos com inseminações ou cobrições que obviamente seriam infrutíferos.

É por isso fundamental criar um sistema de registo dos dados relacionados com a detecção de cios e com os exames veterinários para que se possa acompanhar, entender e prever o que acontece dia após dia (Ricketts 2008).

## **CONDIÇÃO CORPORAL**

O índice de prenhez é mais baixo e o rácio ciclos/concepção é mais elevado em éguas que entram na época reprodutiva com uma condição corporal inferior a 5 (numa escala de 0 a 9) quando comparadas com éguas mais gordas. Nestas éguas magras o estro e a ovulação surgem mais tarde (Henneke *et al.* 1984).

O impacto da condição corporal no período sazonal anovulatório foi muito pronunciado, todas as éguas com baixa condição corporal (índices 3/3,5 em 9) apresentaram baixas concentrações de progesterona, falhas significativas da actividade folicular e com base nos dados ecográficos e nas análises da progesterona, sabe-se que se mantiveram sem ovular durante 6 ou 7 meses. Por seu turno, a maioria das éguas com elevada condição corporal (mais de 7 em 9), mantiveram-se activas em termos reprodutivos durante o inverno e as que apresentaram breves períodos anovulatórios mantiveram uma actividade folicular significativa (Gentry *et al.* 2002).

Com base nestas premissas, as primeiras actividades realizadas neste estágio incluíram o fornecimento de aporte nutricional às éguas em manejo (Figura V).





Sónia Macedo 2014

Figura V. Égua magra (condição corporal 3 numa escala de 0 a 9) no período de transição.

Wespi *et al.* (2014) não conseguiram encontrar qualquer influência da condição corporal na data da ovulação. No entanto, os animais utilizados não exibiam valores extremos como os de estudos anteriores (Henneke *et al.* 1984, Gentry *et al.* 2002), possuindo condições corporais de médias a boas.

## INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial é actualmente uma prática rotineira na reprodução de equinos que permite potenciar o valor genético, minimizar a disseminação de doenças venéreas, diminuir a probabilidade de acidentes envolvendo animais e pessoas, eliminar as barreiras geográficas e evitar deslocações de éguas com poldros jovens (Pinto & Frazer 2013).

Durante este estágio foram realizadas 5 inseminações artificiais com sémen fresco, 2 com sémen refrigerado e foram observadas 7 inseminações com sémen fresco e 5 com sémen refrigerado.

O protocolo seguido para inseminação com sémen fresco implica o seguimento da égua, através de palpações e ecografias transrectais diárias. Quando na égua em estro existir um folículo ovário com 35 mm de diâmetro induz-se a ovulação com a administração intravenosa de 1500 UI de hCG. Estima-se que aproximadamente 85% das éguas ovule 24 a 48 horas depois (Pycock 2008).

A égua é inseminada 24 horas após a administração de hCG, idealmente com uma dose inseminante de  $500 \times 10^6$  espermatozóides móveis ou com uma dose mínima de  $250 \times 10^6$  espermatozóides móveis depositada no corpo do útero (Wilsher s/d). A ovulação deve ser confirmada até 48 horas após a inseminação e se a ovulação não tiver ocorrido a inseminação deve ser repetida (Wilsher s/d).



Para a inseminação com sémen refrigerado o protocolo é semelhante, mas a égua deve ovular até 24 horas após a inseminação, já que a viabilidade média do sémen refrigerado é de 24 horas enquanto que a do sémen fresco é de mais de 48 horas.

Alguns autores advogam que se deve guardar uma dose de sémen para inseminar 12-24 horas após a primeira inseminação, caso não tenha ocorrido ovulação (Wilsher s/d). Opiniões contrárias defendem que o oviduto da égua é o melhor meio de armazenamento de sémen, pelo que se deve inseminar com a dose completa e acrescentam que a primeira inseminação pode provocar uma inflamação uterina que uma inseminação posterior só iria agravar (Pycock 2008).

No período em que decorreu este estágio foram ainda acompanhadas 9 inseminações com sémen congelado. O protocolo para a inseminação com sémen congelado implica igualmente o seguimento da égua através de palpações e ecografias transrectais diárias. Induz-se a ovulação, administrando 1500 UI de hCG IV assim que for encontrado um folículo com 35 mm de diâmetro, 12 horas depois monitoriza-se ecograficamente e após este exame ecografa-se de 6 em 6 horas (Barbacini & Loomis 2007). Insemina-se após a primeira ecografia em que se detectou a ovulação (Barbacini & Loomis 2007). Deve inseminar-se 12 horas antes até 6 horas após a ovulação (Pycock 2008, Aurich 2006). A impossibilidade de prever com precisão a altura da ovulação justifica a utilização deste protocolo.

Se for possível a utilização de duas doses inseminantes o protocolo a seguir implica de igual forma o seguimento diário da égua através de palpações e ecografias transrectais. Assim que se encontrar um folículo com 35 mm de diâmetro a ovulação deverá ser induzida administrando para isso 1500 UI de hCG IV. A égua deve ser inseminada 24 horas depois desta administração e uma segunda inseminação deve realizar-se 40 horas após a administração de hCG (Barbacini & Loomis 2007).

A utilização de sémen congelado na inseminação artificial possibilita o uso de garanhões sem que estes interrompam a sua carreira desportiva, permite a distribuição do sémen à escala mundial (Conboy 2011) e a utilização de sémen retirado da cauda do epidídimo de garanhões que tenham morrido ou sido sujeitos a orquiectomia de urgência (Papa *et al.* 2008).

Como inconvenientes à utilização da inseminação artificial destacam-se a especificidade do equipamento utilizado, as competências e o conhecimento exigidos, a necessidade de treino do garanhão para ejacular na vagina artificial, os custos veterinários e os custos do próprio sémen (Conboy 2011, Pinto & Frazer 2013), e no caso de se tratar de sémen refrigerado e congelado, a sua menor fertilidade comparativamente ao sémen fresco.

O exame ecográfico do útero, realizado 12 a 24 horas após a inseminação revela com frequência a presença de fluído. Este fluído deve ser eliminado de forma a não comprometer a prenhez. A ocitocina até 20 UI TID IV, é o fármaco de eleição para tentar a sua remoção (LeBlanc 2006) e é um protocolo utilizado rotineiramente no CRAV. De realçar que a utilização de 60 UI IM BID de ocitocina, do dia 7 ao dia 14 pós ovulação, prolonga a existência de um

corpo lúteo funcional até 30 a 40 dias, sendo por isso descrita como uma técnica de supressão do estro (Eilts 2012).

A PGF<sub>2α</sub> também induz contracções do útero, mais prolongadas que as induzidas pela ocitocina, mas aplicada 2 dias após a ovulação, pode resultar no atraso da formação de um corpo lúteo funcional devendo por isso ser usada de forma cautelosa (Troedsson 2011).

As lavagens uterinas com soluções salinas tamponadas 6-24 horas após a inseminação/cobrição podem ajudar a limpar o fluído e a inflamação do útero. O transporte do sémen até ao oviduto completa-se ao fim de 4 horas após a inseminação/cobrição, por isso, se a lavagem uterina se realizar entre as 6 e as 24 horas após a inseminação/cobrição não deverá ter efeitos negativos sobre a fertilidade. Deve sublinhar-se que uma resposta inflamatória transitória após inseminação/cobrição, é normal e benéfica para a fertilidade (Troedsson 2011). No entanto, em éguas susceptíveis a duração desta resposta inflamatória é prolongada e resulta muitas vezes em endometrite (Loomis 2006).

A endometrite assume-se como a principal causa de infertilidade devido à incapacidade de remover as bactérias, os espermatozóides e o exsudado inflamatório após inseminação/cobrição. Defeitos nas contracções do miométrio, na drenagem linfática, na actividade mucociliar, na funcionalidade do cérvix, anomalias anatómicas e a degeneração vascular, estão normalmente na base da suscetibilidade à endometrite (LeBlanc & Causey 2009).

Os sinais clínicos de endometrite são acumulação de fluído intra-uterino, descargas vaginais, intervalos inter-éstricos mais curtos. O diagnóstico pode ser confirmado através de citologias e culturas microbiológicas do endométrio. No entanto, estes sinais podem estar ausentes em endometrites sub-clínicas, onde frequentemente se encontram edema excessivo após inseminação/cobrição e ecograficamente uma linha hiperecogénica entre as pregas endometriais (LeBlanc & Causey 2009). Biópsias do endométrio, culturas de biópsia ou de pequenos volumes de lavagens uterinas são meios importantes para o diagnóstico de endometrite subclínica (LeBlanc & Causey 2009).

Uma monitorização ecográfica criteriosa após a inseminação/cobrição é essencial em éguas com endometrite subclínica. Os tratamentos a aplicar podem passar por lavagens após inseminação/cobrição, aplicação de ocitocina IV e antibióticos intra-uterinos, lavagens intra-uterinas 1 hora antes da cobrição/inseminação, aplicação de carbetocina, de cloprostenol, utilização de dilatadores cervicais (PGE<sub>2</sub>), aplicação de antibióticos sistémicos e de quelantes intrauterinos (EDTA-Tris) ou de mucolíticos (DMSO, querosene), administração de corticosteróides (prednisolona, dexametasona) e de imunomoduladores (LeBlanc & Causey 2009).

Por ser uma técnica barata, relativamente fácil e com resultados rápidos, a citologia uterina é o meio de diagnóstico da endometrite mais utilizado embora não forneça informação acerca da causa da inflamação (Kozdrowski et al. 2013). As amostras citológicas devem ser recolhidas no início e meio do estro, altura em que as defesas uterinas estão maximizadas sendo por isso, a presença de bactérias ou de neutrófilos um forte indício de eventuais problemas (inflamação

ou infecção). Estas amostras podem ser recolhidas com zaragatoa, escova ou através de lavagem uterina (LeBlanc 2011a). As amostras obtidas por lavagem uterina são consideradas positivas à presença de inflamação se apresentarem um ou mais neutrófilos em 10 campos magnificados a 1000x e observados com óleo de imersão (LeBlanc 2011b) ou para amostras colhidas com zaragatoa, 1 neutrófilo para 40 células epiteliais contadas em 10 campos magnificados a 400x. No caso da amostra ser colhida com escova o rácio indicativo de inflamação aguda é de 1 neutrófilo para 20 células epiteliais contadas em 10 campos magnificados a 400x (LeBlanc 2011a).

A biópsia uterina é um meio muito útil para aferir sobre a saúde uterina. Para além de fornecer informação sobre o grau de inflamação do endométrio, permite avaliar outros parâmetros patológicos, como por exemplo a fibrose periglandular, as lacunas linfáticas, a distensão glandular quística (Love 2011a).

Kenney estabeleceu uma correlação entre os achados de biópsia e a probabilidade da égua conseguir levar a gestação até ao seu término citado por Love 2011a e revisto por Doig e Waelchli 1992. Doig *et al.* 1981 citados por Love 2011a, reclassificaram a categoria II de Kenney e subdividiram-na em IIA e IIB.

CATEGORIA	% DE PARTOS
I	82%
IIA	74%
IIB	46%
III	0%

Tabela I. Taxa de partos em éguas com úteros de diferentes classificações histológicas (método de Kenney revisto) (adaptado de Doig *et al.* 1981, Love 2011a).

É particularmente importante avaliar através de biópsia, o estado do útero das éguas receptoras de embriões. As taxas de sucesso nas transferências de embriões podem ser, obviamente, optimizadas se os embriões forem transferidos para ambientes uterinos que favoreçam o seu desenvolvimento (Brinsko & Sertich 2013).

No período de estágio relatado foram colhidas, processadas e avaliadas 2 citologias do endométrio e foram colhidas e avaliadas 2 biópsias do endométrio.

## RECOLHA, PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO DE SÉMEN

As recolhas de sémen (9 executadas e 25 observadas ao longo do estágio) foram realizadas com as vaginas artificiais modelos Hannover (figuras VI e VII) e Missouri. A Hannover é uma vagina fácil de montar e de manusear, bem aceite pela generalidade dos garanhões, mas que comporta uma elevada probabilidade de danificar os espermatozóides por choque térmico, sendo fundamental retirar a água imediatamente após a recolha (Allen 2005).



Sónia Macedo 2014

Figuras VI e VII. Recolha de sêmen realizada com VA Hannover.

À semelhança da VA anterior, a Missouri é também fácil de montar e de manusear, mas contrariamente ao que acontece na Hannover, a ejaculação ocorre fora da parte aquecida minimizando o potencial choque térmico. A principal desvantagem associada à utilização da Missouri reside na elevada probabilidade de queda abrupta da temperatura (Allen 2005).

Na maior parte dos países europeus o sêmen do garanhão é recolhido três vezes por semana (às segundas, quartas e sextas), processado e diluído, normalmente num diluidor que contenha fosfocaseína e lactoglobina (por exemplo INRA96), para a dose pretendida, refrigerado a 4-6 °C e inseminado 24 horas depois (Morrell *et al.* 2011).

No CRAV o diluidor utilizado é o EquiPlus® (Minitube) no mínimo de 3 partes de diluidor para 1 de sêmen, sendo a concentração final pretendida para sêmen refrigerado  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Ainda que esta seja uma prática aceite na maioria das raças equinas (excepto nos *Thoroughbred* - Puro Sangue Inglês) existem garanhões que não podem ser utilizados para a produção de sêmen refrigerado já que após processamento, refrigeração e transporte, a sua capacidade de fertilização baixa significativamente (Aurich 2008). Esta quebra parece dever-se à composição do plasma seminal (Birsko *et al.* 2000).

O ejaculado é composto por fluido seminal, espermatozoides, células epiteliais e do sistema imunitário e bactérias (Morrell, 2006). Elevadas concentrações de plasma seminal têm efeitos nocivos no sêmen refrigerado e armazenado (Birsko *et al.* 2000). Embora seja benéfico para a função dos espermatozoides, o plasma seminal é fatal para a sua sobrevivência. Ele contém diversos factores que ajudam a retardar a função dos espermatozoides mas possui também o factor inibitório da motilidade dos espermatozoides e espécies reactivas de oxigénio com

importantes efeitos nefastos na sobrevivência dos espermatozóides. Em garanhões, a remoção da maior parte do plasma seminal, aumenta a sobrevivência dos espermatozóides durante a refrigeração e a criopreservação (Morrell & Rodriguez-Martinez 2009).

A recolha e diluição apenas da fração do ejaculado rica em espermatozóides pode ser uma estratégia para minimizar os efeitos negativos do plasma seminal. No entanto, esta abordagem reduz o total de espermatozóides por colheita. A diluição do sémen com rácios iguais ou superiores a 3 partes de diluidor para 1 de ejaculado é comumente utilizada para ultrapassar os referidos efeitos nocivos do plasma seminal. Importa sublinhar que a utilização de qualquer uma destas duas estratégias em ejaculados de garanhões oligozoospermicos pode não permitir a obtenção de um número adequado de espermatozóides móveis (Birsko *et al.* 2000).

Garanhões com ejaculados oligozoospermicos, muito diluídos ou cujos ejaculados pioram de qualidade após refrigeração, podem beneficiar com a centrifugação e remoção parcial do plasma seminal antes da refrigeração (Birsko *et al.* 2000). De salientar que a remoção de todo o plasma seminal resultou em espermatozóides com pior motilidade após armazenamento a 5 °C durante 24 horas, comparativamente a amostras onde se manteve 5 a 20% do plasma seminal (Birsko *et al.* 2000).

O Sperm Filter® (BotuPharma), uma alternativa à centrifugação recentemente desenvolvida, mostrou a mesma eficiência que a centrifugação na remoção do plasma seminal do ejaculado de garanhões, apresentado taxas de recuperação mais elevadas e sendo menos dispendioso e mais rápido que a centrifugação (Neto *et al.* 2013).

O número de espermatozóides, a motilidade, a morfologia, a integridade das membranas e da cromatina, são parâmetros utilizados para avaliar a qualidade do ejaculado. Sémen com baixa qualidade está normalmente relacionado com subfertilidade, mas o contrário não se verifica necessariamente (Morrell & Rodriguez-Martinez 2009).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para separar os espermatozóides do resto do ejaculado e mesmo para seleccionar subpopulações de espermatozóides com melhor qualidade (Morrell & Rodriguez-Martinez 2009). O plasma seminal é separado por centrifugação do sémen, após diluição do ejaculado, sendo o *pellet* de espermatozóides ressuspenso em diluidor (Morrell & Rodriguez-Martinez 2009).

Quando se tenta maximizar as taxas de recuperação de espermatozóides através da centrifugação, deve sempre ter-se em conta o efeito adverso que esta pode ter na integridade dos espermatozóides. O aumento do tempo ou das forças gravitacionais aumentam as taxas de recuperação de espermatozóides, mas podem alterar a motilidade e a qualidade dos mesmos uma vez que rotações elevadas poderão levar à agregação dos espermatozóides ao fundo dos tubos (Waite *et al.* 2008, Aurich 2006). A perda de espermatozóides no sobrenadante, estimada em aproximadamente 25%, também não pode ser negligenciada (Loomis 2006). É possível obterem-se taxas de recuperação elevadas associadas a forças de centrifugação mais altas nomeadamente com a utilização de *cushion* na centrifugação (Loomis 2006).

O *pellet* de sémen que resulta da centrifugação contém não só espermatozóides viáveis, como também os mortos e as formas anormais, uma vez que os espermatozóides da amostra inicial estão aí concentrados (Morrell & Rodriguez-Martinez 2009). Para melhorar a qualidade dos espermatozóides do *pellet* foram desenvolvidos métodos de seleção de espermatozóides - a migração, a filtração e a centrifugação com colóide (Morrell & Rodriguez-Martinez 2009).

Na migração os espermatozóides móveis deslocam-se, durante um período de incubação, da camada de sémen para um meio específico (Loomis 2006). Esta técnica, sustentada na motilidade dos espermatozóides, processa volumes reduzidos e possui baixas taxas de recuperação (10%-20%) (Loomis 2006).

A filtração alicerça-se na tendência que os espermatozóides mortos ou danificados têm em aderir a superfícies de vidro e a ficarem presos ou ligados a determinados filtros compostos por polissacarídeos (Loomis 2006).

A centrifugação com colóide, baseia-se na seleção de subpopulações de espermatozóides com diferentes densidades específicas. Nesta técnica a centrifugação separa os espermatozóides com base na motilidade e na morfologia, uma vez que os espermatozóides normais se alojam no fundo do tubo formando o *pellet*, enquanto os espermatozóides imóveis ou anormais, as células germinais prematuras e outras células, assim como os componentes dos diluidores, ficam presos no colóide (Loomis 2006).

	<b>MIGRAÇÃO</b>	<b>FILTRAÇÃO</b>	<b>CENTRIFUGAÇÃO COM COLÓIDE</b>
<b>Facilidade de utilização</b>	Requer alguma atenção aos detalhes	Requer alguma atenção aos detalhes	Requer alguma atenção aos detalhes
<b>Equipamento e material necessários</b>	Tubos especiais	Pode ser necessária uma centrífuga, lâ de vidro, Sephadex, filtros	Centrífuga, colóides
<b>Custo por amostra</b>	Baixo, a não ser que o meio contenha hialuronato	Elevado	Elevado
<b>Seleção de espermatozóides</b>	Baseada apenas na motilidade	Baseada na motilidade, na morfologia e nos acrossomas intactos	Baseada na motilidade, morfologia, viabilidade, qualidade da cromatina e talvez nos acrossomas intactos
<b>Remoção do plasma seminal</b>	Sim	Algum	Sim
<b>Remoção de agentes patogénicos</b>	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Sim
<b>Remoção de espécies reactivas de oxigénio</b>	Sim	Dados não disponíveis	Sim
<b>Detritos celulares</b>	Ausente	Pode estar presente	Ausente
<b>Taxa de recuperação de espermatozóides móveis</b>	10-20%	Aproximadamente 60-85%	>50%
<b>Leucócitos</b>	Removidos	Removidos	Removidos
<b>Cromatina dos espermatozóides</b>	Pode ser de fraca qualidade	Dados não disponíveis	Boa
<b>Acrossomas</b>	Podem estar danificados	Aumenta a percentagem de intactos	Aumenta a percentagem de intactos

Tabela II. Propriedades dos diferentes métodos de selecção de espermatozóides (adaptada de Morrell 2012).

## **AValiação de sémen**

Durante o estágio curricular foram realizadas aproximadamente 60 avaliações de sémen e observadas 32.

A par da fertilidade das éguas e da gestão do seu período reprodutivo, a utilização de sémen de boa qualidade é um factor chave para a prenhez, por isso é imperativo que se realize uma correcta avaliação do sémen (Samper 2009, Estrada & Samper 2007).

Imediatamente após a recolha, o sémen deve ser mantido a 37 °C, assim como todo o equipamento que com ele irá contactar. Alterações bruscas de temperatura resultam em choque térmico e consequentemente em alterações irreversíveis nos espermatozóides (Samper 2009).

## **AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA**

O ejaculado deve ser filtrado logo após ou mesmo durante a recolha, colocado num recipiente estéril, aquecido e graduado, por forma a que se possa aferir facilmente o volume que contém. Na avaliação macroscópica é ainda determinada a cor do ejaculado que pode variar desde o branco acinzentado até ao branco leitoso (Papa et al. 2011, Estrada & Samper 2007).

## **AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA**

Uma dose inseminante deve conter idealmente 500 milhões de espermatozóides móveis (Estrada & Samper 2007). Coloca-se uma gota de sémen (5 a 10  $\mu\text{L}$ ) numa lâmina aquecida, cobre-se com uma lamela também aquecida e avalia-se a motilidade do ejaculado num microscópio com placa aquecida. A motilidade decresce mais rapidamente nos extremos da lamela porque estão mais expostos ao ar e secam mais facilmente. Assim, as avaliações devem ser feitas em vários campos do centro da amostra (Samper 2009, Estrada & Samper 2007). Esta avaliação subjectiva da motilidade, quando levada a cabo por indivíduos experientes, fornece informação muito útil (Samper 2009).

Os softwares de análise da motilidade pretendem superar a subjectividade inerente à análise individual propondo uma análise objectiva. O equipamento utilizado (CASA) é caro, mas fornece informações relativas a parâmetros impossíveis de um operador analisar, por exemplo a velocidade dos espermatozóides, a amplitude do desvio lateral da cabeça, entre outros.

## **CONCENTRAÇÃO**

Depois de avaliar a motilidade é fundamental saber qual é a concentração do ejaculado.

O hemocítmetro é um método directo para contar os espermatozóides. Comparativamente aos outros métodos de contagem este é mais moroso, mas é também para alguns autores, como Estrada & Samper (2007), o meio mais preciso e fiável de contagem de espermatozóides. Outros autores têm apontado falhas a este instrumento de contagem, Hu *et al.* (2006) verificaram que o hemocítmetro sobrevaloriza a concentração do ejaculado.

Antes de contar na câmara de Neubauer (hemocítmetro) é necessário diluir uma amostra do ejaculado em formol salino ou em água. Após uma eficaz homogeneização monta-se a câmara de Neubauer preenchendo os seus dois retículos. Contam-se os espermatozóides em 5 quadrados de cada retículo e a variação entre cada um dos lados não pode ser superior a 20%, caso contrário repetem-se as contagens. A média aritmética da contagem de cada um dos lados, multiplica-se pela diluição efectuada, por 50 (factor do hemocítmetro) e por 1000 (para expressar a concentração em  $\text{cm}^3/\text{mL}$ ), o valor obtido representa o número de espermatozóides por mililitro (Samper 2009, Papa *et al.* 2011).

Os espectrofotómetros medem a opacidade de uma alíquota do ejaculado, sendo que



quanto maior a opacidade maior a concentração do ejaculado. Estes métodos de contagem são mais rápidos, mas são também mais caros do que o hemocitómetro, só podem ser usados em sémen sem diluidor e a presença de células epiteliais, glóbulos vermelhos ou leucócitos pode aumentar a opacidade e consequentemente a concentração lida. Estes dispositivos possuem valores limite superiores e inferiores a partir dos quais a sua precisão é duvidosa, pelo que os ejaculados com concentrações extremamente elevadas ou extremamente baixas não são por isso, correctamente analisados por estes métodos (Samper 2009).

O citómetro de fluxo é um meio muito preciso de contagem (Eustache *et al.* 2001, Prathalingham *et al.* 2006). No entanto, os custos monetários e de tempo associados a esta ferramenta tornam-na inacessível à prática clínica de reprodução assistida e apenas justificável para efeitos de investigação (Prathalingham *et al.* 2006).

A ChemoMetec desenvolveu o NucleoCounter® SP-100™, que utiliza a fluorescência para medir a concentração dos espermatozóides utilizando iodeto de propídeo. Os diluidores que contêm gema de ovo ou leite magro, o gel do ejaculado e outros contaminantes não interferem na contagem já que apenas é contado o DNA corado das células.

## **MORFOLOGIA**

A qualidade do sémen não deve basear-se apenas na avaliação da sua motilidade. Existem defeitos morfológicos que aparentemente não afetam a motilidade mas que se refletem de forma negativa na fertilidade, por exemplo as anomalias de cabeça. Existem várias anomalias (cabeças anormais, gotas proximais e distais) que não apresentam relação significativa com a motilidade, sugerindo que estes defeitos possam estar presentes em ejaculados com qualquer tipo de motilidade (rápidos, lentos, lineares, não lineares e imóveis) (Love 2011b).

É fundamental assegurar que todo o equipamento que contacta com o sémen desde a recolha até ao processamento esteja a 37 °C, já que qualquer variação de temperatura afecta a qualidade dos espermatozóides (Estrada & Samper 2007). Estes defeitos iatrogénicos que podem ser infligidos aos espermatozóides incluem não só o referido choque térmico resultando em peças intermédias flectidas, como também o choque osmótico que pode resultar em caudas enroladas (Samper 2009).

A avaliação da morfologia dos espermatozóides deve realizar-se com uma ampliação de 1000x ou superior. Com esta finalidade, podem utilizar-se preparações *wet mount* fixadas com formol salino ou com glutaraldeído e observadas num microscópio de contraste de fase (Brito 2007).

A morfologia pode também ser observada com um microscópio óptico em lâminas coradas com India ink, William's, Karras, Spermac, Diff-Quick, eosina nigrosina, entre outros corantes (Brito 2007).

A eosina é um corante supra-vital porque não penetra nas células que possuam membranas intactas. Deste modo, as células com membranas intactas não ficam coradas e as que têm as membranas danificadas ainda que parcialmente, coram de rosa/vermelho. A visualização dos

espermatozóides é facilitada pelo fundo roxo provido pela nigrosina. Devem contar-se pelo menos 100 células e classificar-se de acordo com as seguintes categorias: espermatozóides normais, anomalias acrossómicas ou da cabeça, cabeças soltas, gotas proximais, gotas distais, anomalias da peça intermédia, caudas dobradas ou enroladas. A presença de células germinativas, de leucócitos e de eritrócitos deve também ser registada (Brito 2007).

## **INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS E DOS ORGANELOS**

Para avaliar a integridade das membranas, o estado do acrossoma, da peça intermédia e das mitocôndrias podem ser utilizados corantes fluorescentes.

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com lectinas, a aglutinina da ervilha *Pisum sativum* (FITC-PSA) ou a aglutinina do amendoim *Arachis hypogea* (FITC-PNA), ligam-se aos componentes do acrossoma e podem ser utilizados para aferir da integridade dos acrossomas de um ejaculado (Brinsko *et al.* 2011b).

O acrossoma deve estar intacto antes e durante a migração dos espermatozóides pelo útero e até que a ligação à zona pelúcida se concretize. A capacidade fertilizante do espermatozóide perde-se se houver reacção acrossómica prematura (Silva & Gadella 2006).

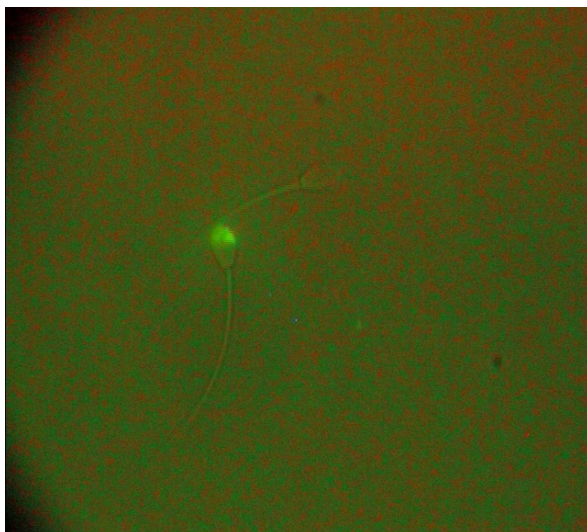
O conjugado FITC-PNA é utilizado em espermatozóides vivos. A inexistência de fluorescência é indicativa de integridade dos acrossomas e o contrário, a fluorescência, indica que os acrossomas já não estão intactos ou que ocorreu reacção acrossómica.

Uma variação desta técnica pode ser realizada em espermatozóides fixados e permeabilizados. Neste caso, os acrossomas completamente fluorescentes são considerados intactos e os que revelem fluorescência incompleta, irregular ou equatorial (figura VIII), apresentam sinais de quebra de integridade ou indiciam reacção acrossómica (Silva & Gadella 2006).

O SYBR-14 e o iodeto de propídeo são utilizados para avaliar a integridade das membranas. Estes corantes fluorescentes penetram a membrana dos espermatozóides e ligam-se ao DNA. O SYBR-14 passa as membranas intactas, liga-se ao DNA e emite fluorescência verde, enquanto o iodeto de propídeo penetra nas membranas danificadas emitindo fluorescência vermelha (Brinsko *et al.* 2011b).

As membranas mitocondriais podem ser avaliadas utilizando corantes como o Mitotracker™ JC-1 que penetra selectivamente nestas membranas emitindo fluorescência verde ou vermelha-laranja consoante esteja na presença respectivamente, de baixo ou de elevado potencial de membrana (Brinsko *et al.* 2011b, Silva & Gadella 2006).

Estes são apenas alguns dos inúmeros corantes fluorescentes que podem ser utilizados na avaliação das membranas e dos organelos dos espermatozóides (Brinsko *et al.* 2011b).



Sónia Macedo 2014

Figura VIII. Dois espermatozóides observados em microscopia de fluorescência após fixação e permeabilização. O espermatozóide com acrossoma intacto exibe plena fluorescência (FITC-PNA).

## LAVAGEM UTERINA PARA RECOLHA DE EMBRIÕES

Durante o período de estágio foram realizados 4 *flushings* uterinos para recolha de embriões.

O embrião desce do oviduto para o útero 5 dias após a fertilização e aumenta rapidamente de diâmetro (Hinrichs & Choi 2005). Os *flushings* uterinos para recolha de blastocistos realizaram-se no 7º ou 8º dia após a fertilização, com o propósito de serem utilizados num projecto de investigação onde se pretende vitrificar blastocistos de equinos. Esta técnica, a vitrificação, produz uma solidificação “tipo vidro” das células vivas evitando completamente a formação de cristais durante o arrefecimento e durante o aquecimento das células criopreservadas (Kuleshova *et al.* 2002).

A recolha de embriões foi realizada através da técnica não cirúrgica transvaginal, utilizando um sistema fechado de duas vias e com meio composto por 2/3 litros de lactato de ringer.

O *flushing* realiza-se por gravidade. O meio passa através do filtro de embriões e o filtro ou o seu conteúdo, são examinados à lupa estereoscópica na tentativa de localizar o embrião (Hinrichs & Choi 2005).

ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO	IDADE APROXIMADA (DIAS)
Mórula	6
Blastocisto inicial	6,5 a 7
Blastocisto	7 a 7,5
Blastocisto Expandido	> 7,5

Tabela III. Classificação dos embriões equinos quanto ao estágio de desenvolvimento e idade aproximada (Alvarenga *et al.* 2009).

## **RECOLHA E SELEÇÃO DE OÓCITOS**

Os oócitos podem ser recolhidos de éguas vivas, aspirando os folículos ováricos através de punção ou laparotomia do flanco, ou ainda de forma transvaginal, mas também a partir de ovários de éguas mortas. Se uma égua morrer, os ovários podem ser retirados e os oócitos recolhidos abrindo os folículos e raspando o seu interior com uma cureta de forma a libertar os complexos cumulus-oócito que ainda estão aderidos à camada da granulosa dos folículos. Utilizando esta técnica podem ser recuperados vários oócitos de um ovário. Por serem retirados de folículos que não estavam perto da ovulação estes são oócitos imaturos (Hinrichs & Choi 2005).

Durante o estágio curricular foi possível participar em 4 recolhas e selecção de oócitos de éguas a partir de ovários recolhidos em matadouro - actividade inserida num projecto de investigação relacionado com a vitrificação de oócitos.

# TRABALHO EXPERIMENTAL

## INTRODUÇÃO

Alguns autores advogam que a utilização da centrifugação no processamento de sémen fresco e refrigerado, deve restringir-se a casos pontuais, por exemplo em garanhões oligozoospermicos ou em “maus refrigeradores” (Len et al. 2010). Os efeitos deletérios da centrifugação nos espermatozóides têm sido amplamente estudados tendo sido propostas algumas formas para os minimizar.

Uma dessas formas é a centrifugação com *cushion*. Esta técnica tem sido cada vez mais utilizada na centrifugação de sémen de garanhão já que segundo alguns autores, separa de forma eficiente os espermatozóides do plasma seminal, com redução do volume do ejaculado, elevadas/excelentes taxas de recuperação de espermatozóides e aparentemente com poucos danos sobre os mesmos (Bliss et al. 2012, Nicolas et al. 2012, Edmond et al. 2012). Em condição óptimas estão descritas taxas de recuperação superiores a 90% (99% versus os 77% da centrifugação tradicional), sem prejuízo para a função dos espermatozóides (Loomis, 2006).

A adição de um hidrato de carbono de elevada viscosidade (*cushion*) no fundo dos tubos de centrifugação, previne a agregação do *pellet* de espermatozóides ao fundo desses tubos (Sanchez et al. 2009), permitindo aumentar a força e o tempo de centrifugação (1000 g até 20 minutos) para alcançar melhores taxas de recuperação sem baixar a viabilidade (Brinsko et al. 2011c).

Os resultados positivos descritos após a centrifugação com *cushion* e por outro lado os efeitos nocivos, nomeadamente as perdas, imputados à centrifugação, levaram à criação de um trabalho experimental, tendo como principal objectivo comparar as taxas de recuperação de espermatozóides após a centrifugação com e sem *cushion*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O sémen foi recolhido de dois garanhões Puro Sangue Lusitano (3 ejaculados de cada), com 23 e 24 anos de idade. Para a recolha de sémen foi utilizada uma VA (Missouri ou Hannover de acordo com a preferência de cada garanhão), utilizando um manequim ou uma égua em cio. A VA foi lubrificada com gel não espermicida e cheia de água quente até obter uma temperatura interna de 45-50 °C.

Após recolha o ejaculado foi filtrado (filtro descartável de celulose Minitube) e imediatamente avaliado para volume, motilidade subjectiva progressiva e concentração.

A concentração do ejaculado foi medida utilizando Spermacue® (Minitube) e para ejaculados com leitura  $\leq 150 \times 10^6$  espermatozóides/mL a concentração foi reavaliada usando uma câmara de Neubauer.

A concentração foi reajustada para  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL utilizando EquiPlus® (Minitube) sem antibiótico, composto por leite magro, açúcares e tampão, pré-aquecido a 37 °C.

Em concentrações  $\leq 50 \times 10^6$  espermatozóides/mL o sémen foi utilizado sem diluição prévia.

#### **AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE SUBJECTIVA PROGRESSIVA**

A motilidade subjectiva progressiva foi avaliada em alíquotas de 5 µL, em lâminas e lamelas aquecidas, examinadas num microscópio óptico (200x) com placa aquecida a 37 °C, às 0 horas (imediatamente após a centrifugação) e às 24, 48 e 72 horas.

#### **ANÁLISE DO SÉMEN ASSISTIDA POR COMPUTADOR (CASA)**

A análise do sémen assistida por computador (ISAS®) foi realizada em alíquotas de 5 µL colocadas numa câmara D4C20 (ISAS®) aquecida, às 0 horas (imediatamente após a centrifugação) e às 24, 48 e 72 horas.

A motilidade total (MT), a % de espermatozóides rápidos e a % de linearidade, foram parâmetros avaliados em cinco campos.

#### **MORFOLOGIA ESPERMÁTICA**

A percentagem de defeitos espermáticos foi avaliada em lâminas coradas com eosina nigrosina, num microscópio óptico (1000x) com óleo de imersão e para tal foram analisados 100 espermatozóides às 48 horas após refrigeração em Equitainer.

#### **INTEGRIDADE DOS ACROSSOMAS**

Às 48 horas após refrigeração, 1 mL de cada amostra foi centrifugado a 300 x g durante 5 minutos. As amostras foram lavadas em PBS e novamente centrifugadas a 300 x g durante 5 minutos. Após ressuspensão em PBS (1 mL), 10 µL de cada amostra foram colocados numa lamela, dentro duma placa de Nunc e deixados a repousar sem luz, à temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Após fixação em 400 µL de formaldeído a 4% em PBS durante 10 minutos, sem luz, à temperatura ambiente, os espermatozóides foram permeabilizados com 0,1% de Triton em 3% de BSA e PBS, durante 10 minutos.

A incubação com PNA (1 µL/mL) foi realizada em PBS durante 30 minutos, à temperatura ambiente e sem luz.

As amostras foram lavadas com PBS, colocadas numa lâmina com Slowfade® e avaliadas num microscópio de fluorescência (100x). Foram analisados duzentos espermatozóides por amostra e contados os acrossomas corados, ou seja, os acrossomas intactos.

## PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Após a avaliação da motilidade, concentração e eventual diluição, o sémen foi colocado em dois tubos Falcon de 15 mL.

Na amostra controlo foram colocados 14 mL de sémen e na amostra centrifugada com *cushion* foram colocados 11 mL de sémen. De seguida foram depositadas no fundo do tubo da amostra centrifugada com *cushion*, 3 mL de CushionFluid™ (Minitube), à temperatura ambiente, utilizando para isso um cateter estéril de gato, com estilete, 1.3 x 130 mm cortado aproximadamente 1 cm na ponta, e uma seringa de 5 mL. As amostras foram imediatamente centrifugadas, a 900 x g durante 10 minutos (controlo) e a 1000 x g durante 12 minutos (*cushion*).

O sobrenadante foi retirado e no caso da amostra com *cushion*, este foi aspirado do fundo do tubo com o cateter acoplado a uma seringa de 5 mL.

Após homogeneização, procedeu-se à avaliação da concentração das amostras numa câmara de Neubauer. As concentrações foram reajustadas para  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL, utilizando o diluidor EquiPlus® (Minitube), foram avaliadas as motilidades subjectiva e objectiva e as amostras foram refrigeradas.

## REFRIGERAÇÃO

As amostras foram refrigeradas em tubos Falcon de 15 mL, dentro de um Equitainer após terem sido embrulhados numa bolsa térmica e colocados num recipiente isotérmico.

## ESTATÍSTICA

A análise e comparação das médias obtidas, foi realizada em Teste-T no IBM® SPSS® Statistics Version 22. Em todos os casos o nível de significância foi estabelecido em  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

### MOTILIDADE

Não houve diferença ( $P > 0.05$ ) nas motilidades subjectiva e objectiva das duas amostras, controlo e centrifugada com *cushion* (tabela IV).

AMOSTRA	TEMPO	MOTILIDADE SUBJECTIVA PROGRESSIVA %	MOTILIDADE TOTAL (CASA) %
CONTROLO	0 Horas	56.3 ± 11.1	70.8 ± 15.5
	24 horas	40.0 ± 18.2	51.2 ± 23.0
	48 horas	32.5 ± 15.4	50.8 ± 17.8
	72 horas	16.8 ± 14.5	39.3 ± 15.9
CUSHION	0 Horas	55.0 ± 14.1	72.3 ± 9.5
	24 horas	44.2 ± 13.2	50.5 ± 16.0
	48 horas	30.8 ± 17.7	43.4 ± 15.6
	72 horas	25.0 ± 12.6	43.4 ± 15.0

Tabela IV. Motilidade subjectiva e objectiva (CASA) para a amostra controlo e para a amostra centrifugada com *cushion* (média ± desvio padrão).

Não houve diferença ( $P > 0.05$ ) para os parâmetros de motilidade (% de espermatozóides móveis progressivos, % de espermatozóides rápidos, % de motilidade linear) entre o grupo controlo e o centrifugado com *cushion* às 0 horas (após centrifugação e diluição) e às 24, 48 e 72 horas após refrigeração (tabela V).

AMOSTRA	TEMPO	ESPERMATOZÓIDES MÓVEIS PROGRESSIVOS %	ESPERMATOZÓIDES RÁPIDOS %	MOTILIDADE LINEAR %
CONTROLO	0 Horas	42.9 ± 13.8	27.4 ± 9.9	34.6 ± 2.8
	24 horas	30.8 ± 17.0	20.5 ± 13.8	30.6 ± 3.3
	48 horas	27.2 ± 15.5	18.9 ± 12.7	28.9 ± 1.7
	72 horas	21.5 ± 12.3	13.9 ± 10.3	26.6 ± 2.6
CUSHION	0 Horas	45.4 ± 7.9	33.3 ± 9.3	35.4 ± 6.8
	24 horas	33.2 ± 13.1	23.0 ± 10.7	32.9 ± 4.8
	48 horas	27.3 ± 11.7	18.7 ± 11.1	28.3 ± 2.1
	72 horas	23.6 ± 5.5	14.3 ± 4.4	28.0 ± 6.2

Tabela V. Parâmetros de motilidade para a amostra controlo e a amostra centrifugada com *cushion* avaliados por CASA (média ± desvio padrão).

## MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DOS ACROSSOMAS

O gráfico I mostra os resultados obtidos após tratamento com FITC-PNA às 48 horas após refrigeração. Não foram encontradas diferenças ( $P > 0.05$ ) entre o controlo (intactos  $78.5 \pm 4.3$ ) e a amostra centrifugada com *cushion* (intactos  $77.8 \pm 3.9$ ) no que respeita à integridade dos acrossomas.

Ainda no gráfico I podem ser analisadas as médias da avaliação morfológica realizada às 48 horas e constatar que não existem diferenças ( $P > 0.05$ ) nas duas amostras quanto à percentagem de espermatozóides com morfologia normal (controlo: espermatozóides com



morfologia normal  $59.5 \pm 7.4$ ; amostra centrifugada com *cushion*: espermatozóides com morfologia normal  $60.2 \pm 4.5$ ).

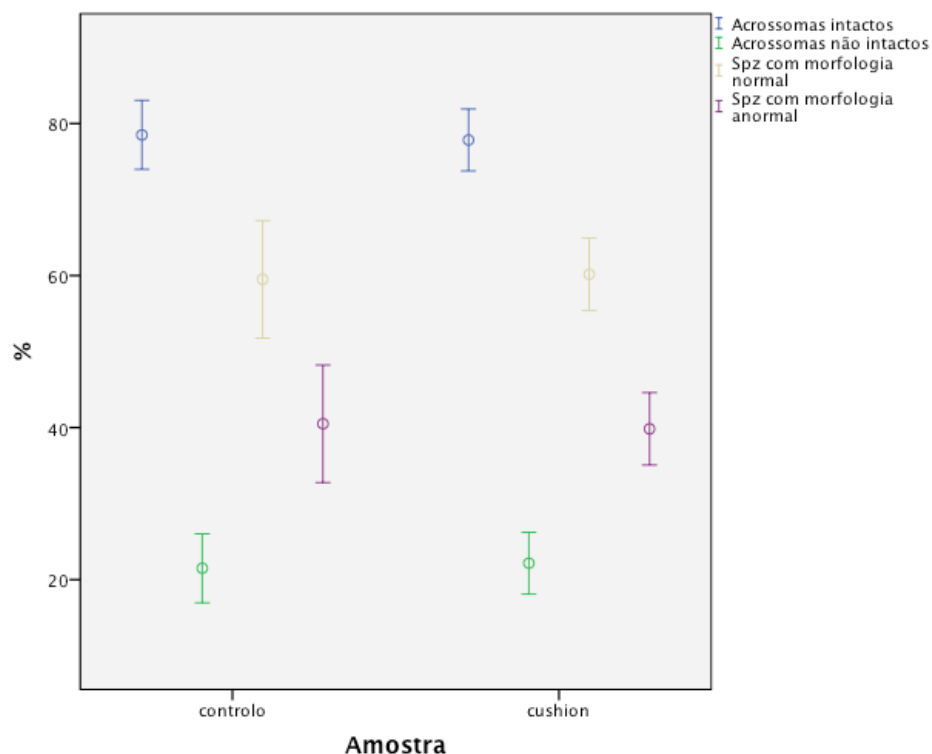


Gráfico I. Percentagem de acrossomas intactos/não intactos e de espermatozóides com morfologia normal/anormal após 48 horas de refrigeração (média  $\pm$  desvio padrão).

## TAXA DE RECUPERAÇÃO

Não foram observadas diferenças ( $P > 0.05$ ) entre as taxas de recuperação de espermatozóides após centrifugação tradicional e com *cushion*, respectivamente  $74.2 \pm 13.9\%$  e  $87.7 \pm 11.7\%$ .

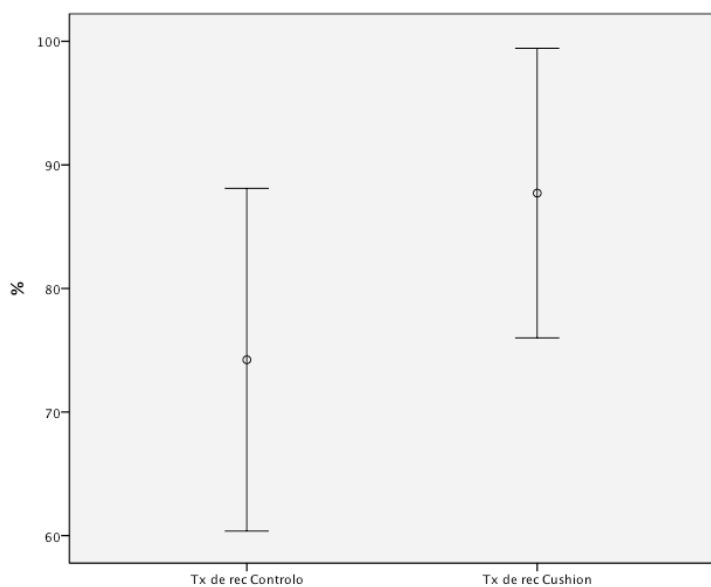


Gráfico II. Taxa de recuperação de espermatozóides calculada imediatamente após a centrifugação (média  $\pm$  desvio padrão).

## DISCUSSÃO

As taxas de recuperação conseguidas após centrifugação com *cushion* foram numericamente mais elevadas que as obtidas após centrifugação sem *cushion*. No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas.

A centrifugação sem *cushion* foi realizada com forças gravitacionais e tempo que já haviam resultado em taxas de recuperação na ordem dos 75% (Len *et al.* 2010), encorajando a utilização de protocolos que aumentem as taxas de sedimentação e assim recuperem mais espermatozóides móveis e viáveis (Ferrer *et al.* 2012).

Por não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de recuperação, as motilidades subjectiva e objectiva, os índices morfológicos e de integridade acrossómica nos dois protocolos analisados, a centrifugação com *cushion* parece ser desnecessária, consumindo recursos sem que o retorno obtido justifique a sua utilização, deve ser tomado em consideração que o estudo foi feito com um número reduzido de observações. No entanto, estes resultados estão de acordo com estudos prévios (Len *et al.* 2013, Volkmann 1987) em que as amostras são maiores.

A adição e sobretudo, a remoção do *cushion* podem ser potenciais e importantes fontes de erro (Len *et al.* 2013) conferindo às taxas de recuperação uma significativa dependência do operador.

Este estudo deverá ser testado em ejaculados com concentrações iniciais superiores às apresentadas ( $\geq 200 \times 10^6$ ) e os resultados comparados com os aqui apresentados para concentrações iniciais mais baixas.

Importa por fim realçar o alerta de Len *et al.* (2013) para o facto de não serem conhecidos os efeitos que o volume de *cushion* deixado após aspiração poderá ter na égua inseminada.

## CONCLUSÃO

As actividades realizadas neste estágio podem enquadrar-se em dois grandes grupos, as relacionadas com a prática clínica de reprodução e as que se inserem na prática laboratorial.

A fertilidade enquanto resultado de um conjunto complexo de factores que envolve o garanhão, a égua e o manejo animal, alicerçou toda a prática clínica realizada.

Os índices de fertilidade não estão apenas dependentes da qualidade do sêmen ou do estado em que se encontra o endométrio da égua. A época reprodutiva deve ser criteriosamente preparada, o manejo das éguas reprodutoras não pode ser enfatizado apenas quando ocorre a primeira ovulação do ano. A alimentação e o restante manejo devem ser cuidadosamente tratados antes mesmo do início da transição vernal.

O acompanhamento regular das éguas permite saber o exacto momento em que estas começam a ciclar e entender o período de transição vernal, evitando más interpretações que conduzam a gastos desnecessários.

Uma gestão próxima e atenta de todos os factores envolvidos, permite antecipar problemas, programar actividades e esperar resultados concretos, realistas e mensuráveis.

O médico veterinário desempenha um papel preponderante na consciencialização dos proprietários. É fundamental que interiorizem que para que um nascimento ocorra na data desejada é preciso muito mais do que agendar cobrições/inseminações para um determinado intervalo de tempo.

No trabalho laboratorial, os erros que obrigaram a recomençar e a reajustar os protocolos teóricos para que a sua exequibilidade fosse possível, permitiram entender o rigor científico.

Identificar no “terreno” os problemas e desenvolver em laboratório soluções para os ultrapassar foram os princípios que conduziram a prática laboratorial. Esta é sem dúvida uma vertente muito aliciante da investigação, a que parte da realidade, que identifica problemas no trabalho diário e que os tenta superar através de uma investigação norteada por sólidos e rigorosos pressupostos científicos.

Para concluir, este estágio curricular permitiu a realização da maioria das técnicas de reprodução assistida que compõem a prática clínica e o trabalho laboratorial que lhe é inerente, resultando na aquisição de inúmeras competências de entre as quais se destacam competências ao nível do saber-fazer.

## BIBLIOGRAFIA

- Allen WR (2005) "The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding" **Reproduction in Domestic Animals** 40, 310–329
- Alvarenga MA, Carmo MT, Oliveira JV (2009) **Transferência de embriões na espécie equina**, Botocatu-SP
- Aurich C (2008) "Recent advances in cooled-semen technology" **Animal Reproduction Science** 107, 268–275
- Aurich C (2006) "Advances in artificial insemination" **Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association**, 230-234
- Aurich J, Aurich C (2006) "Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction" **Reproduction in Domestic Animals** 41, 275-279
- Barbacini S, Loomis P (2007) "Artificial insemination (AI) using cooled and frozen semen" **BEVA Equine Stud Medicine Course**, Select Breeders Services Italia
- Bergfelt DR (2009) "Anatomy and physiology of the mare" in Samper JC (Ed.) **Equine breeding Management and Artificial Insemination**, 2nd edition, Saunders Elsevier, 113-131
- Bliss SB, Voge JL, Hayden SS, Teague SR, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Varner DD (2012) "The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions" **Theriogenology** 77, 1232-1239
- Brinsko S. P., Sertich P. (2013) "The use of endometrial biopsies in formulating a treatment plan" **Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Conference**, 339-342
- Brinsko ST, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (2011a) "Transrectal ultrasonography in broodmare practice" **Manual of Equine Reproduction**, 3 rd edition, 54-72
- Brinsko ST, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (2011b) "Examination of the stallion for breeding soundness" **Manual of Equine Reproduction**, 3 rd edition, 176-206
- Brinsko ST, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (2011c) "Semen preservation" **Manual of Equine Reproduction**, 3 rd edition, 207-227

- Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL (2000) "Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage" **Theriogenology** 54, 129-136
- Brito LFC (2007) "Evaluation of stallion sperm morphology" **Clinical Techniques in Equine Practice** 6, 249–264
- Conboy HS (2011) "Management of stallions in artificial insemination" in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction**, 2nd edition., Wiley- Blackwell, 1198-1207
- Edmond AJ, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Teague SR, Varner DD (2012) "Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm" **Theriogenology** 77, 959-966
- Eilts B. (2012) "Equine theriogenology" em [http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/equine\\_index.htm](http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/equine_index.htm) consultado em 20 de Março de 2014
- Estrada AJ, Samper JC (2007) "Evaluation of raw semen" in Samper JC, Pycocock JF, McKinnon AO (Ed.) **Current Therapy in Equine Reproduction**, Saunders Elsevier, 253-257
- Eustache F, Jouannet P, Auger J (2001) "Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration" **Journal of Andrology** 22, 558-567
- Ferrer MS, Lyle SK, Eilts BE, Eljarrah AH, Paccamonti DL (2012) "Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen" **Theriogenology** 78, 1814-1823
- Gentry LR, Thompson Jr. DL, Gentry Jr. GT, Davis KA, Godke RA, Cartmill JA (2002) "The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period" **Journal of Animal Science** 80, 2695-2703
- Henneke DR, Potter GD, Kreider JL (1984) "Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares" **Theriogenology** 21, 897–909
- Hinrichs K, Choi Y (2005) "Assisted reproductive techniques in the horse" **Clinical Techniques in Equine Practice** 4, 210-218
- Hu YA, Lu JC, Lu NQ, Shao Y, Huang YF (2006) "Comparison of four methods for sperm counting" **Zhonghua Nan Ke Xue** 12, 222-227

Kozdrowski R, Gumienka J, Sikora M, Andrzejewski K, Nowak M (2013) "Comparison of the cytology brush and cotton swab in the cytological evaluation of the endometrium in mares with regard to fertility" **Journal of Equine Veterinary Science** 33, 1008-1011

Kuleshova LL, Lopata A (2002) "Vitrification can be more favorable than slow cooling" **Fertility and Sterility** 78, 449-454

LeBlanc MM (2011a) "Uterine cytology" in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction**, 2nd edition, Wiley- Blackwell, 1922-1928

LeBlanc MM (2011b) "How to perform and interpret findings from a low-volume uterine flush" **Proceedings of the 57th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioner** 57, 32-36

LeBlanc MM (2006) "Reproduction deduction - part 2", **Proceedings of the North American Veterinary Conference** 20, 139-142

LeBlanc MM, Causey RC (2009) "Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility" **Reproduction in Domestic Animals** 44, 10–22

Len JA, Beehan DP, Lyle SK, Eilts BE (2013) "Cushioned versus noncushioned centrifugation: Sperm recovery rate and integrity" **Theriogenology** 80, 648-653

Len JA, Jenkins JA, Eilts BE, Paccamonti DL, Lyle SK, Hosgood G (2010) "Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm" **Theriogenology** 73, 225-231

Loomis PR (2006) "Advanced methods for handling and preparation of stallion semen" **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 22, 663-676

Love C (2011a) "Endometrial biopsy" in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction**, 2nd edition, Wiley- Blackwell, 1929-1939

Love C (2011b) "Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions" **Theriogenology** 76, 547-557

McCue PM, Scoggin CF and Lindholm ARG (2011) "Estrus" in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction**, 2nd edition., Wiley- Blackwell, 1717-1727

Morrell JM (2012) "Stallion sperm selection: past, present, and future trends" **Journal of Equine Veterinary Science** 32, 436–440

Morrell JM (2006) "Update on semen technologies for animal breeding" **Reproduction in Domestic Animals** 41, 63-67

Morrell JM, Macias Garcia B, Pena FJ, Johannisson A (2011) "Processing stored stallion semen doses by single layer centrifugation" **Theriogenology** 76, 1424–1432

Morrell JM, Rodriguez-Martinez H (2009) "Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review" **The Open Andrology Journal** 1, 1-9

Neto CR, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua Jr. JA, Papa FO, Alvarenga MA (2013) "Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen" **Journal of Equine Veterinary Science** 33, 40-43

Nicolas M, Alvarez M, Borragán S, Martinez-Pastor F, Chamorro CA, Alvarez-Rodriguez M, de Paz P, Anel L (2012) "Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (maxifreeze, cushion fluid equine, and puresperm 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa" **Theriogenology** 77, 1119-1128

Papa FO, Alvarenga MA, Dell'Aqua JR JA, Monteiro GA (2011) **Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen de Equino**, Botupharma Biotecnologia Animal

Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'Aqua Jr. JA, Zahn FS, Alvarenga MA (2008) "Freezing of stallion epididymal sperm" **Animal Reproduction Science** 107, 293–301

Pinto C, Frazer GS (2013) "Reproduction" in Mair TS, Love S, Schumacher J, Smith RKW, Frazer GS (Ed.) **Equine Medicine, Surgery and Reproduction**, 2<sup>nd</sup> edition, Saunders Elsevier, 283-308

Prathalingham NS, Holt WW, Revell SG, Jones S, Watson PF (2006) "The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration" **Journal of Andrology** 27, 257-262

Pycock JF (2008) "Artificial insemination" **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association**, 224-234

Ricketts S (2008) "Management of the broodmare" **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association**, 212-21

Samper JC (2009) "Artificial insemination with fresh and cooled semen" in Samper JC (Ed.) **Equine breeding Management and Artificial Insemination**, 2nd edition, Saunders Elsevier, 165-174

Sanchez R, Gomez I, Samper JC (2009) "Artificial insemination with frozen semen" in Samper JC (Ed.) **Equine breeding Management and Artificial Insemination**, 2nd edition, Saunders Elsevier, 175-183

Sharp DC (2011) "Vernal transition into the breeding season" in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction**, 2nd edition, Wiley- Blackwell, 1704-1715

Silva PF, Gadella BM (2006) "Detection of Damage in Mammalian Sperm Cells" **Theriogenology** 65, 958-978

Troedsson M (2011) "Endometritis" in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction**, 2nd edition, Wiley- Blackwell, 2608-2619

Volkman DH (1987) "Acrosomal damage and progressive motility of stallion semen frozen by two methods in 0.5-milliliter straws" **Theriogenology** 27, 689-698

Waite JA, Love CC, Brinsko SP, Teague SR, Salazar JL Jr, Mancill SS, Varner DD (2008) "Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation" **Theriogenology** 70, 704-714

Wespi B, Sieme H, Wedekind C, Burger D (2014) "Exposure to stallion accelerates the onset of mares' cyclicity", **Theriogenology**

Wilsher S (sem data) "Insemination protocols for fresh, cooled and frozen semen" Notas gentilmente cedidas pela autora ao Professor Doutor António Rocha



# ANEXOS

## ANEXO I. FICHA GINECOLÓGICA DA GORONGOSA

### ICBAS Ficha Ginecológica

Proprietário:

Idade: Égua: **GORONGOSA**  
Data de entrada:

Garanhão:

Nº Sémen

#### ANAMNESE REPRODUCTIVA

Ano anterior: Monta Natural- - I.AF- - IAR- - IAC- -  
Vazia- - Abortada- - Gestante- -

Este ano : IAF- - IAR- - IAC- -

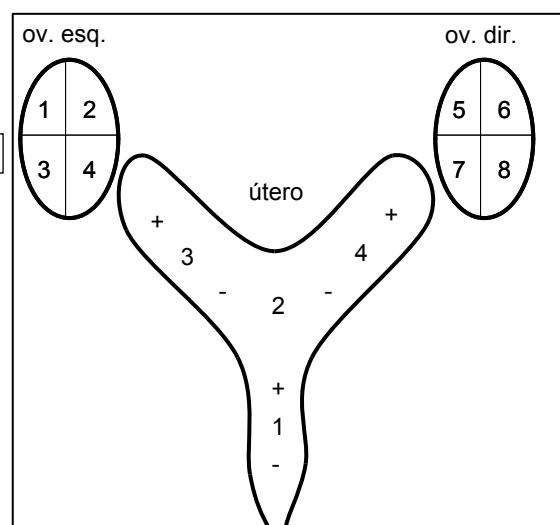
#### EXAMES COMPLEMENTARES

Bacteriologia uterina/colo -

Serologias arterite/leptospira -

Citologia -

Registo Ecográfico



Data	Hora	Ovário esquerdo	Ovário direito	Útero	Observações	I.A/TE.
29.01.2014		vários folículos pequenos	vários fol. pequenos	pequeno deformado edema 0		
17.02.2014		vários fol. pequenos	vários fol. pequenos	pequeno deformado edema 0		
18.02.2014		vários fol. pequenos	vários fol. pequenos	pequeno deformado edema 0		
21.02.2014		vários fol. pequenos máx. 21x15 mm	vários fol. pequenos máx. 19x14 mm	pequeno deformado edema 0		
26.02.2014		vários fol. pequenos	máx. 20x24 mm	edema 0		
27.02.2014		ovários pequenos fol. máx. 18x16 mm	26x26 mm	edema 1		
03.03.2014		21x24 mm	17x12 mm	edema0		
06.03.2014		vários fol. pequenos	vários fol. pequenos máx. 26x23 mm	edema 0		

07.03.2014		vários fol. pequenos máx. 24x18 mm	vários fol. pequenos máx. 26x22 mm	edema 0		
10.03.2014		20x15 mm	30x26 mm	edema 1		
12.03.2014		cacho de uva	cacho de uva	edema 3	sinais de cio	
17.3.2014		cacho de uva	cacho de uva	edema 1		
19.03.2014		vários fol. pequenos máx. 32x18 mm	cacho de uva	edema 0		
21.03.2014		cacho de uva	cacho de uva	edema 0		
24.03.2014		39x41 mm	vários fol. pequenos	edema 2		
28.03.2014		50x26 mm	vários fol. pequenos máx. 25x20 mm	edema 1		
31.03.2014		30x22 mm 48x36 mm	37x31 mm	edema 1		
03.04.2014		vários fol. máx. 27x28 mm	43x39 mm	edema 2		
07.04.2014		vários fol. máx. 32x20 mm	49x46 mm	edema 2+	sinais de cio	
09.04.2014	12:00	21x20 mm	50x48 mm	edema 1		
10.04.2014	15:30	32x35 mm	39x41 mm	edema 2		
11.04.2014		39x36 mm	41x46 mm	edema 2		
14.04.2014		49x40mm	2 fol. 30x48 mm	edema 1+	sinais de cio	
15.04.2014		50x43 mm	2 fol. 41x33 mm	edema 1		
17.04.2014		58x44 mm	42x39 mm	edema 1+	sinais de cio	
21.04.2014		CL	34x36 mm	edema 1		
28.04.2014	11:15	vários fol. pequenos	40x42 mm cl em regressão	edema 1-		
02.05.2014	11:30	25x25 mm	38x38 mm	edema 1-		

## ANEXO II. CASUÍSTICA

	REALIZADO	OBSERVADO
Palpação/ecografia	220	189
Ecografia testicular e transrectal garanhão	1	5
Inseminação com sémen fresco	5	7
Inseminação com sémen refrigerado	2	5
Recolha de sémen	9	25
Avaliação de sémen	60	32
<i>Flushing</i> de embrião	4	0
Lavagem uterina	1	1
Levar garanhão ao manequim	1	34
Monta natural	0	4
Inseminação com semen congelado	0	8
Seguimento de inseminação sémen congelado	9	0
Vaginoscopia	2	5
Citologia uterina	2	3
Biópsia endométrio	2	1
Procura e seleção de oócitos de égua	4	0
Clínica ambulatoria	11	0
Diagnóstico de gestação	3	20

### **ANEXO III. PROTOCOLO: CENTRIFUGAÇÃO COM E SEM *CUSHION***

1. Recolher e filtrar o sêmen
2. Avaliar:
  - motilidade subjectiva
  - motilidade objectiva (CASA)
  - concentração (SpermaCue e hemocitómetro)
3. Se a concentração  $> 50 \times 10^6$  espermatozóides/mL diluir para  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL
4. Retirar do ejaculado diluído duas amostras:
  - 4.1. Tubo 1 - 14 mL de ejaculado
  - 4.2. Tubo 2 - 11 mL de ejaculado. Equilibrar o *cushion* à temperatura ambiente. Com uma seringa acoplada a um cateter colocar imediatamente antes da centrifugação 3 ml de *cushion* por baixo do sêmen
5. Centrifugar:
  - 5.1. Tubo 1 - centrifugar a  $900 \times g$  durante 10 minutos
  - 5.2. Tubo 2 - centrifugar a  $1000 \times g$  durante 12 minutos
6. Retirar o sobrenadante:
  - 6.1. Tubo 1 - retirar o sobrenadante
  - 6.2. Tubo 2 - retirar o sobrenadante e com uma seringa acoplada a um cateter e aspirar o *cushion*
7. Avaliar nas duas amostras a concentração
8. Calcular a taxa de recuperação de espermatozóides
9. Diluir ambas as amostras para  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL
10. Avaliar nas duas amostras (0 horas):
  - motilidade subjectiva
  - motilidade objectiva (CASA)
11. Refrigerar num Equitainer.
12. Avaliar as duas amostras às 24 horas:
  - motilidade subjectiva
  - motilidade objectiva (CASA)
13. Avaliar as duas amostras às 48 horas:
  - motilidade subjectiva
  - motilidade objectiva (CASA)

- morfologia (eosina nigrosina)
- Integridade dos acrossomas FITC-PNA

14. Avaliar as duas amostras às 72 horas:

- motilidade subjectiva
- motilidade objectiva (CASA)

## **ANEXO IV. PROTOCOLO: FITC-PNA**

1. Centrifugar 1 mL da amostra a 300 x g durante 5 minutos
2. Lavar com PBS
3. Centrifugar durante 5 minutos a 300 x g
4. Ressuspender em 1 mL de PBS
5. Diluir para  $10 \times 10^6$  espermatozoides/mL
6. Colocar 10  $\mu$ L numa lamela dentro duma placa de Nunc e deixar repousar 10 minutos, à temperatura ambiente e sem luz
7. Fixar em 400  $\mu$ L de formaldeído a 4% e deixar repousar 15 minutos, à temperatura ambiente e sem luz
8. Retirar o formaldeído e permeabilizar com 0.1% Triton em 3% BSA em PBS durante 10 minutos à temperatura ambiente e sem luz
9. Incubar em PNA (1  $\mu$ g/mL) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente e sem luz
10. Lavar em PBS
11. Colocar a amostra numa lâmina com 5  $\mu$ L de SlowFade®
12. Avaliar as amostras num microscópio de fluorescência (100x)
13. Avaliar 200 espermatozoides e contar os acrosssomas corados